

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MENGKUDU
(*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP EKSPRESI *Inducible*
Nitric Oxide Synthase (iNOS) DAN INTERLEUKIN-6
(IL-6) PADA ORGAN PARU HEWAN TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA**

SKRIPSI



Oleh :
NOVITA SARI
135130101111024

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MENGKUDU
(*Morinda citrifolia L.*) TERHADAP EKSPRESI *Inducible*
Nitric Oxide Synthase (iNOS) DAN INTERLEUKIN-6
(IL-6) PADA ORGAN PARU HEWAN TIKUS
PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh :

NOVITA SARI
135130101111024



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK BUAH MENGKUDU (*Morinda citrifolia* L.) TERHADAP EKSPRESI *Inducible* *Nitric Oxide Synthase* (iNOS) DAN INTERLEUKIN-6 (IL-6) PADA ORGAN PARU HEWAN TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL ASMA

Oleh :

NOVITA SARI

NIM. 135130101111024

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal 3 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc

NIP. 19560210 198403 2 001

Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed

NIP. 19770131 200501 1 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES

NIP. 19600903 198802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah:

Nama : Novita Sari
NIM : 135130101111024
Program Studi : Fakultas Kedokteran Hewan
Penulis Skripsi berjudul : **Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Ekspresi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) dan Interleukin-6 (IL-6) pada Organ Paru Hewan Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Asma**

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termasuk di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.
3. Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 25 Januari 2018

Yang menyatakan,

Novita Sari

NIM. 135130101111024

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)
terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan
Interleukin-6 (IL-6) pada Organ Paru Tikus
(*Rattus norvegicus*) Model Asma**

ABSTRAK

Asma merupakan inflamasi kronik saluran pernafasan yang disebabkan oleh faktor genetik maupun lingkungan dan diperparah oleh adanya infeksi rongga mulut dari paparan lipopolisakarida (LPS). Asma dapat diterapi dengan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Kandungan flavonoid pada ekstrak buah mengkudu berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap penurunan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Interleukin-6 (IL-6) pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma. Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan hewan coba tikus jantan, sebanyak 20 ekor dibagi dalam empat kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif, kontrol positif, dan dua kelompok perlakuan (dosis 50mg/kg BB dan dosis 75mg/kg BB). Tikus model asma dibuat dengan pemberian sensitasi alergi dengan ovalbumin (OVA) secara intraperitoneal dan inhalasi, serta pemberian LPS dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* secara intrasulkuler. Ekspresi iNOS dan IL-6 diamati dengan teknik imunohistokimia jaringan paru. Data yang diperoleh dianalisis secara kuantitatif dengan analisis statistik ragam ANOVA satu arah dan dilanjutkan dengan uji *Tukey* $\alpha:5\%$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu pada tikus model asma berpengaruh nyata ($p<0,05$) terhadap ekspresi iNOS dan IL-6 antar perlakuan. Pemberian dosis optimum 75mg/kg BB mampu menurunkan ekspresi iNOS dan IL-6 yang menunjukkan hasil tidak berbeda nyata dengan kelompok negatif. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak buah mengkudu dengan dosis optimal 75mg/kg BB dapat menurunkan ekspresi iNOS dan IL-6 pada organ paru tikus model asma.

Kata Kunci: Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.), Asma, IL-6, iNOS

Effect of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Fruit Extract on Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression and Interleukin-6 (IL-6) in Lung Asthma Rat (*Rattus norvegicus*) Models

ABSTRACT

Asthma is a chronic inflammation of respiratory tract caused by genetic or environmental factors and becomes more severe by the presence of oral cavity infection caused by exposure of lipopolysaccharide (LPS). Asthma can be treated with noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) extract. Noni fruit extract contains flavonoid that has anti-inflammation and antioxidant in it. The aim of this research was to determine effect of noni fruit extract on decreasing *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) expression and Interleukin-6 (IL-6) in lung asthma rat (*Rattus norvegicus*) models. This experiment uses Completely Randomized Design (CRD), with 20 male rats which divided into four groups: negative control, positive control, and two groups of therapy (dosage 50mg/kg BW and dosage 75mg/kg BW). The asthma rat models was made by induction of allergic sensitization used ovalbumin (OVA) intraperitoneally and inhalation, and induction LPS of *Phorphyromonas gingivalis* with intrasulcular. Expression of iNOS and IL-6 was observed with immunohistochemistry method in lung tissue. Quantitative data analyzed with one-way ANOVA and continued *Tukey* test $\alpha=5\%$. The results showed that noni fruit extract in asthma rat models significantly effect ($p<0.05$) on expression of iNOS and IL-6 between each treatments. Optimum dose of 75mg/kg BW decreased the expression of iNOS and IL-6 which showed no significant differences with negative group. In conclusion noni fruit extract in optimum dosage of 75mg/kg BW can decrease expression of iNOS and IL-6 in lung asthma rat models.

Key word: Noni (*Morinda citrifolia* L.), Asthma, IL-6, iNOS

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas rahmat yang diberikan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Interleukin-6 (IL-6) pada Organ Paru Hewan Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma”**. Penelitian ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya.

Penyusun menyampaikan terima kasih sebesar-besarnya kepada seluruh pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini, secara khusus penyusun menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. drh. Masdiana C. Padaga, M.App.Sc selaku Dosen Pembimbing I yang telah berkenan memberikan bimbingan, kesabaran, waktu, motivasi sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi dengan baik.
2. Bapak Wibi Riawan, S.Si., M.Biomed selaku Dosen Pembimbing II atas segala bimbingan, kesabaran, nasihat, waktu, dan arahan yang diberikan tiada henti kepada penulis.
3. Ibu Agri Kaltaria Anisa, S. Farm, Apt dan drh. Beta Purnama Sari, M. Si selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan saran dan masukan dalam penulisan skripsi ini.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
5. Seluruh Jajaran Dekanat, Dosen, dan Staff Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Keluarga penulis Bapak Suparmin, Ibu Suwanti dan Muhammad Widodo yang selalu memberi kasih sayang, dorongan dan dukungan moril dan materil untuk menyelesaikan studi penulis.
7. Keluarga besar penulis yang selalu memberi semangat dan bantuan.

8. Tim penelitian “Morinda Family” yakni Venna, Dean, Ajeng, Defira atas kerjasama selama penelitian.
9. Sahabat penulis selama perkuliahan Previana, Nela, Nurul, Debora, Pungky, Tisun, Dyasti dan Amelia yang selalu memberikan semangat dan dukungan selama menjadi mahasiswa di kota rantau.
10. Seluruh sahabat B-TIS, SIX-SENSE, Morinda, Sholihin, mBakyyu, dan Bambang yang selalu menyemangati dan memotivasi penulis.
11. Seluruh pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu.

Akhir kata, penulis berharap semoga Tuhan membalas segala kebaikan serta ketulusan yang telah diberikan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dan menambah ilmu pengetahuan bukan hanya untuk penulis namun untuk pembaca yang lain.

Malang, 25 Januari 2018

Penulis



Halaman

ix

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu	30
4.6.4 Dosis Ekstrak Buah Mengkudu.....	31
4.6.5 Analisis Ekspresi iNOS dan IL-6 dengan Metode Imuno- histokimia.....	31
4.6.5.1 Isolasi Organ Paru	31
4.6.5.2 Ekspresi iNOS dengan pewarnaan Imunohisto- kimia.....	32
4.6.5.3 Ekspresi IL-6 dengan pewarnaan Imunohisto- kimia.....	33
4.6.5.4 Pengamatan Ekspresi iNOS dan IL-6	33
4.7 Analisis Data.....	34
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
5.1 Pengaruh Terapi Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Ekspresi dari <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) pada Organ Paru Tikus Model Asma	35
5.2 Pengaruh Terapi Ekstrak Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.) Terhadap Ekspresi dari Interleukin-6 (IL-6) pada Organ Paru Ti- kus Model Asma.....	39
BAB 6. PENUTUP	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Kelompok Penelitian	27
5.1 Rata-rata jumlah sel makrofag yang mengekspresikan <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) paru tikus	36
5.2 Rata-rata jumlah sel makrofag yang mengekspresikan interleukin-6 (IL-6) paru tikus	40



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	7
2.2 <i>Morinda citrifolia</i> L.	10
2.3 Patogenesis Asma	12
2.4 Reaksi “ <i>Early Onset</i> ” pada Asma	13
2.5 Reaksi Lambat pada Asma.....	14
2.6 Struktur Dinding Sel Bakteri Gram.....	16
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	21
5.1 Ekspresi Perwarnaan <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS) Imunohistokimia Organ Paru tikus (1000x)	35
5.2 Ekspresi Perwarnaan Interleukin-6 (IL-6) Imunohistokimia pada Organ Paru tikus (1000x).....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Layak Etik	50
2. Sertifikat Ekstrak dari Meteria Medica	51
3. Determinasi Tanaman Mengkudu	52
4. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	53
5. Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu	56
6. Perhitungan Dosis Ekstrak Buah Mengkudu	57
7. Pengambilan Sampel dan Pembuatan Preparat Histopatologi Paru	60
8. Prosedur Imunohistokimia	61
9. Data Hasil Ekspresi <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> (iNOS)	63
10. Hasil Uji Statistika Ekspresi iNOS dengan Aplikasi SPSS	64
11. Data Hasil Ekspresi Interleukin-6 (IL-6)	68
12. Hasil Uji Statistika Ekspresi IL-6 dengan Aplikasi SPSS	69
13. Data Respirasi pada Hewan Coba Model Asma	73
14. Dokumentasi Penelitian	74



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/singkatan	Keterangan
%	: <i>Prosentase</i>
μg	: <i>Mikrogram</i>
AlOH ₃	: <i>Aluminium Hidroksida</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variant</i>
AOAC	: <i>Association of Analytical Communities</i>
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
BB	: <i>Berat Badan</i>
BNJ	: <i>Beda Nyata Jujur</i>
CD4	: <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8	: <i>Cluster of Differentiation 8</i>
cm	: <i>Centimeter</i>
CMC	: <i>Carboxymethyl Cellulose</i>
DAB	: <i>Diaminobenzidine</i>
g	: <i>Gram</i>
GMCSF	: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
H ₂ O ₂	: <i>Hidrogen Peroksida</i>
IFN-γ	: <i>Interferon-γ</i>
NF-κB	: <i>Nuclear Factor KappaB</i>
IgE	: <i>Imunoglobulin-E</i>
IL-2	: <i>Interleukin-2</i>
IL-3	: <i>Interleukin-3</i>
IL-4	: <i>Interleukin-4</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
iNOS	: <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
kDa	: <i>Kilodalton</i>
kg	: <i>Kilogram</i>
LBP	: <i>Lypopolysacharide Binding Protein</i>
LPS	: <i>Lipopolisakarida</i>
mg	: <i>Miligram</i>
NaCl	: <i>Natrium Klorida</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
NOS	: <i>Nitric Oxide Synthase</i>
OH	: <i>Hidroksida</i>
OVA	: <i>Ovalbumin</i>
PBS	: <i>Pospat Buffer Saline</i>
PFA	: <i>Paraformaldehiyde Acid</i>
RAL	: <i>Rancangan Acak Lengkap</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SA-HRP	: <i>Strep Avidin Horse Radish Peroxidasae</i>
Th2	: <i>T Helper-2</i>
TLR-4	: <i>Toll Like Reseptor-4</i>

TNF- α	: <i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TNF- β	: <i>Tumor Necrosis Factor Beta</i>
TGF- β	: <i>Transforming Growth Factor-Beta</i>
PAF	: <i>Platelet Activating Factor</i>
UPT	: <i>Unit Pelaksana Teknis</i>



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Asma merupakan inflamasi kronis pada saluran pernapasan (Nguyen *et al*, 2010). Asma terjadi pada hewan diantaranya kucing dan anjing. Kucing merupakan hewan yang paling banyak menderita asma atau dikenal sebagai *Feline Allergic Asthma* (Reinero, 2011).

Prevalensi asma pada kucing di dunia sebesar 1% (Carey, 2011). Cornell Feline Health Center, tahun 2014 mencatat jumlah populasi kucing domestik di Amerika lebih dari 800.000 ekor menderita asma baik akut maupun kronis. Prevalensi tertinggi asma pada kucing terjadi karena adanya kombinasi penyebab antara faktor genetik dan faktor lingkungan. Paparan alergen diantaranya akibat udara yang tercemar zat kimia, asap kendaraan, dan limbah industri (Reinero, 2011). Inflamasi kronis pada asma menginduksi lepasnya mediator inflamasi yang mengakibatkan bronkokonstriksi, hipersensitivitas, hipersekresi mukus, dan edema (Pertiwi dkk., 2012). Hewan yang mengalami asma memiliki gejala klinis batuk, *wheezing*, bersin, dan sesak napas (Nguyen *et al*, 2010).

Kondisi kesehatan rongga mulut pada hewan dapat mempengaruhi tingkat keparahan asma. Penelitian yang dilakukan di Amerika menunjukkan bahwa 20-50% pasien asma yang meninggal diakibatkan infeksi sekunder pada rongga mulut (Smits, 2009). Lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif *Porphyromonas gingivalis* bersifat anaerob pada plak gigi hewan yang mampu meningkatkan keparahan asma. Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang dapat menstimulus respon sel-sel mediator inflamasi (Utomo, 2012).

Feline asthma merupakan inflamasi akibat alergi pada saluran pernapasan yang dipicu oleh alergen, sehingga menghasilkan reaksi hipersensitifitas tipe 1 yang dimediasi oleh IgE dan didominasi oleh sel *T-helper* 2 (Olah, 2014). Lipopolisakarida dari bakteri *Phorphyromonas gingivalis* akan membentuk interaksi LPS-LBP melalui *Toll-like receptors-4* (TLR-4). Proses tersebut dapat mengaktivasi Th2 dan sel-sel mediator inflamasi lainnya (Pertiwi dkk., 2012).

Lipopolisakarida (LPS) akan menyebabkan kerusakan organ paru dan menginduksi produksi dan pelepasan mediator inflamatori seperti eosinofil, neutrofil, monosit, makrofag dan sitokin (Ahmada dkk., 2012). Sitokin yang berlebihan menimbulkan tanda-tanda asma alergi, yaitu *hyper-responsiveness* saluran nafas, peningkatan jumlah eosinofil dan sel mast, produksi IgE, hipersekresi lendir, fibrosis subepitel, yang akan menyebabkan berbagai tingkat perubahan struktural saluran napas (Broide, 2008). Makrofag akan menghasilkan sitokin pro-inflamatori (IL-6) dan produksi *Nitric Oxide* (NO) yang dikatalis oleh enzim *Nitric Oxide Synthase* (NOS) yaitu *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). Peningkatan ekspresi sitokin IL-6 dan iNOS dapat digunakan sebagai salah satu parameter yang menunjukkan adanya proses peradangan pada suatu jaringan (Mufidah dkk., 2012 dan Ardinata, 2008).

Terapi penderita asma umumnya menggunakan obat yang bertindak sebagai bronkodilator (salbutamol) untuk melancarkan aliran udara ke paru-paru, antihistamin (fexofenadine) sebagai penghambat histamin yang akan berikatan dengan reseptor untuk mencegah timbulnya reaksi alergi, dan antiinflamasi (kortikosteroid) untuk mengurangi reaksi inflamasi, gejala asma, reaktivitas

bronkus, dan memperbaiki fungsi paru. Golongan obat tersebut memiliki efek samping diantaranya hipertensi dan gelisah akibat penggunaan bronkodilator dan antihistamin, serta gejala yang akan muncul kembali apabila berhenti mengkonsumsi jenis obat tersebut (Rengganis, 2008).

Penggunaan tanaman sebagai obat alternatif dipercaya oleh sebagian besar warga Indonesia, bahkan di negara maju dan negara berkembang lainnya (Rizki dkk., 2015). Terapi menggunakan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dapat menjadi terapi yang efektif. Buah mengkudu mengandung bahan-bahan seperti flavonoid, alkaloid, saponin, asam amino, antraquinon, glikosida, dan tannin (Faroka dkk., 2013). Menurut Rizki dkk., (2015), flavonoid dapat menurunkan produksi sitokin dan radikal bebas berlebih. Berdasarkan fakta tersebut, peneliti terdorong untuk meneliti tingkat efektifitas buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai antioksidan dan antiinflamasi alami sehingga mampu menurunkan produksi sitokin interleukin-6 (IL-6) dan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) yang dihasilkan akibat adanya inflamasi.

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui bahwa ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma pada tikus yang diinduksi asma akibat paparan ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

- 1) Apakah pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dapat menurunkan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) ?
- 2) Apakah pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) pada paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dapat menurunkan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) ?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan, maka penelitian ini dibatasi pada:

- 1) Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar dengan berat badan 150-250 gram dan umur 8-12 minggu yang didapat dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Penggunaan hewan model dalam penelitian ini telah mendapatkan sertifikat laik etik.
- 2) Pembuatan hewan model asma dengan cara injeksi 10µg ovalbumin dengan 1,5mg adjuvan Alumunium Hidroksida ($AlOH_3$) dalam 200µg *Phoshpat Buffer Saline* (PBS) secara intraperitoneal dan ovalbumin sebanyak 1mg dalam 1ml NaCl 0,9 secara inhalasi dengan menggunakan nebulizer. Lipopolisakarida (LPS) yang digunakan adalah LPS dari bakteri *Phorpyromonas gingivalis* dan diinduksi sebanyak 0,2µg LPS dalam 0,2ml

Phosphat Buffer Saline (PBS) secara intrasulkuler. Lipopolisakarida digunakan untuk memperparah gejala asma (Utomo, 2012).

- 3) Ekstrak tanaman yang digunakan adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan pelarut etanol 70%, didapatkan dari UPT Materia Medica Kota Batu yang sudah dilengkapi dengan taksonomi, morfologi, nama simplisia serta kandungannya (Lampiran 2 dan 3).
- 4) Dosis terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diberikan pada tikus model asma yaitu sebesar 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB selama 2 minggu dimulai pada hari ke-22 yang diberikan menggunakan alat bantu sonde
- 5) Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) dengan teknik imunohistokimia.

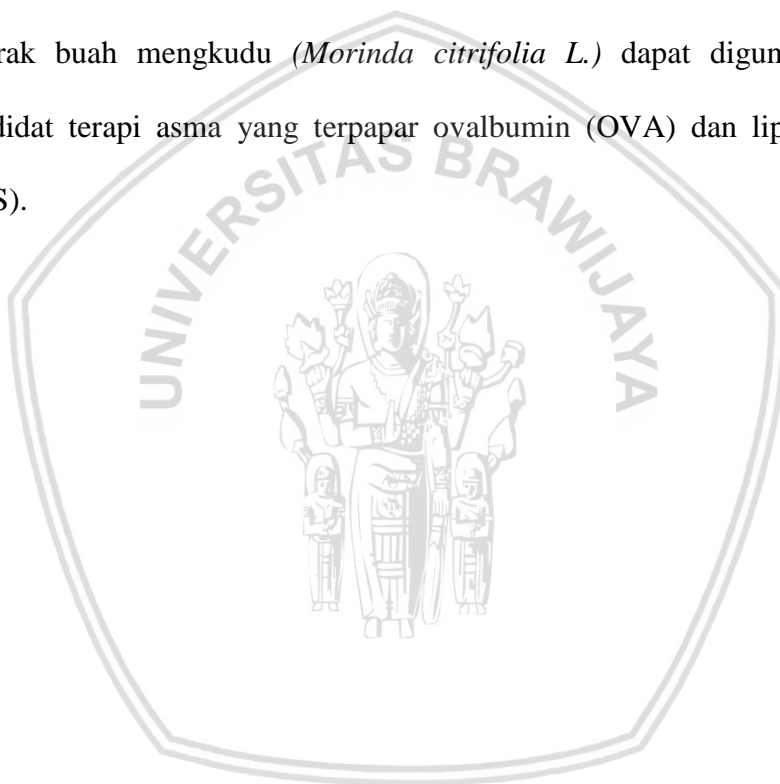
1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

- 1) Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap penurunan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma.
- 2) Mengetahui pengaruh pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) dengan model asma.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L*) terhadap penurunan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada organ paru hewan tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS) serta membuktikan bahwa ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dapat digunakan sebagai kandidat terapi asma yang terpapar ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS).



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hewan coba yang digunakan untuk studi proses inflamasi dan gangguan fungsi pernapasan ada banyak jenis dan spesies. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) merupakan hewan yang umum digunakan untuk pengembangan model penyakit alergi seperti asma, rinitis, alergi makanan telah banyak dilakukan pada tikus (Nials *et al*, 2008). Hewan percobaan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar. Menurut Rita (2001), taksonomi tikus putih adalah:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodensia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Galur	: Wistar



Gambar 2.1 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Johnson, 2012).

Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.1**) antara lain rambut berwarna putih, mata merah, memiliki hidung tumpul, panjang tubuh total 440 mm, panjang ekor 205 mm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih pendek dari 20-23 mm dan pada usia dewasa berat badannya kisaran 100-150 gram dan masuk dewasa pada usia 40-60 hari. *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit (Pertiwi dkk., 2012). Berat badan *Rattus norvegicus* dewasa jantan berkisar antara 450-520 g dan betina 250-300 g, temperatur 35,9-37,5⁰ C, konsumsi pakan 5-6 g/100 g BB dan konsumsi minum 10-12 mL /100g BB (Rita, 2001).

Penggunaan tikus sebagai model asma dikarenakan tikus memiliki beberapa keunggulan yakni produksi IgE yang merupakan antibodi anafilaksis (hipersensitivitas terhadap antigen) terbesar, kemampuan tikus untuk mengalami *airway hipereaktivitas* yang lebih lama dan memiliki antibodi yang lengkap seperti sitokin, *growth factor*, dan *cell surface marker* membuat spesies ini sesuai untuk penelitian tentang respon imun pada saluran pernafasan (Zosky *et al*, 2007 dan Shin *et al*, 2009).

2.2 Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Mengkudu adalah tumbuhan keluarga kopi-kopian (*Rubiaceae*), yang pada mulanya berasal dari wilayah daratan Asia Tenggara dan kemudian menyebar sampai ke Cina, India, Filipina, Hawaii, Tahiti, Afrika, Australia, Karibia, Haiti, Fiji, Florida dan Kuba (Sitepu dan Josua, 2012). Tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) memiliki ciri umum yaitu pohon dengan tinggi 4-6 meter. Batang

berkelok-kelok, dahan kaku, dan kulit berwarna coklat keabu-abuan. Daun tebal berwarna hijau, berbentuk jorong lanset dengan ukuran 15- 50 x 5-17 cm, tepi daun rata, serat daun menyirip dan tidak berbulu. Akar tanaman mengkudu berwarna coklat kehitaman dan merupakan akar tunggang. Bunga tanaman mengkudu yang masih kuncup berwarna hijau, saat mengembang akan berubah menjadi berwarna putih dan harum. Buah mengkudu berbentuk bulat lonjong dengan diameter mencapai 7,5-10 cm, permukaan terbagi dalam sel-sel polygonal berbintik-bintik. Buah mengkudu muda berwarna hijau, saat tua warna akan berubah menjadi kuning. Buah yang matang akan berwarna putih transparan dan lunak. Aroma buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) seperti keju busuk karena percampuran asam kaprik dan asam kaproat. Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mengandung beberapa zat aktif utama diantaranya adalah flavonoid, *scopoletin*, *octoanoic acid*, kalium, vitamin C, alkaloid, antrakuinon, bsitosterol, karoten, vitamin A, *linoleat acid*, alizarin, amino acid, acubin, *L-asperuloside*, *kaproat acid*, *kaprilat acid*, *ursolat acid*, rutin, *proxeronine* dan terpenoid (Sari, 2015).

Pemanfaatannya lebih banyak diperkenalkan oleh masyarakat Jawa yang selalu memanfaatkan tanaman herbal untuk mengobati beberapa penyakit (Aryadi, 2014). Klasifikasi mengkudu berdasarkan Aryadi (2014), adalah sebagai berikut :

Subkingdom	: Tracheophyta
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteridae

Ordo	: Rubiales
Famili	: Rubiaceae
Subfamili	: Rubioideae
Genus	: <i>Morinda</i>
Spesies	: <i>Morinda citrifolia</i> L



Gambar 2.2 *Morinda citrifolia* L. (Sari, 2015).

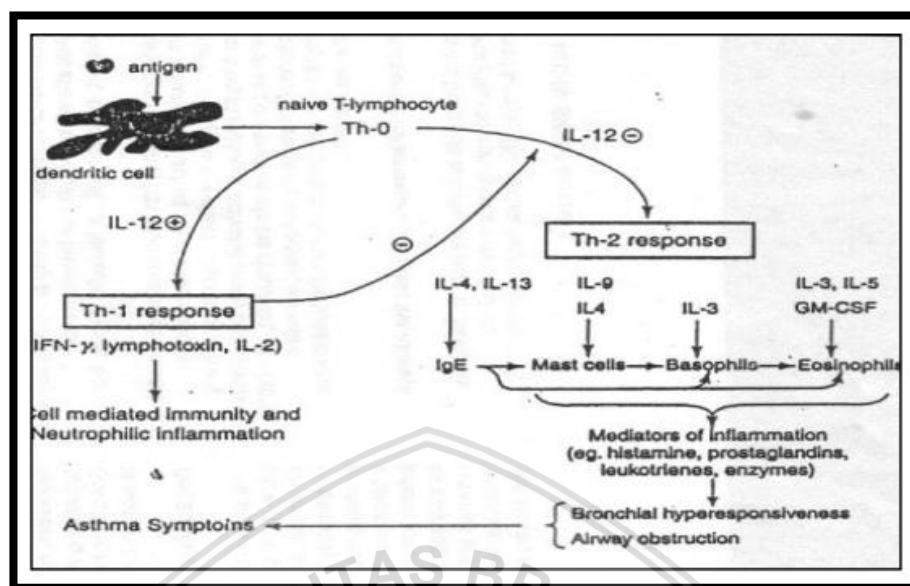
Zat aktif utama dalam buah mengkudu meliputi flavonoid, terpenoid, antibakteri, *ascorbic acid*, beta karoten, *xeronine*, dan *proxeronine*. Selain itu, mengkudu juga mengandung antraquinon dan *scolopetin* yang aktif sebagai antimikroba, terutama bakteri dan jamur yang penting dalam mengatasi peradangan dan alergi (Sitepu dan Josua, 2012).

Unsur antibakteri yang terdapat dalam buah mengkudu ini juga berfungsi untuk pengobatan infeksi kulit, pilek, demam, dan masalah kesehatan lainnya yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang dimiliki oleh sebagian besar tumbuhan hijau dan biasanya terkonsentrasi pada biji, buah, kulit buah, kulit kayu, daun dan bunga. Flavonoid dapat menghambat sel-sel

mediator inflamasi, sintesis sitokin Th2, IgE, dan degranulasi sel mast. Studi literatur menyatakan bahwa terapi pemberian flavonoid pada hewan model asma menunjukkan hasil yang baik (Rahmawati, 2009). Flavonoid yang terkandung dalam buah mengkudu dapat membantu mencegah penyakit yang berhubungan dengan stres oksidatif dan memiliki aktivitas antimikroba, antikarsinogenik, antioksidan, antiplatelet, antiiskemik, antialergi, dan antiinflamasi (Setyawan, 2008).

2.3 Patomekanisme Asma

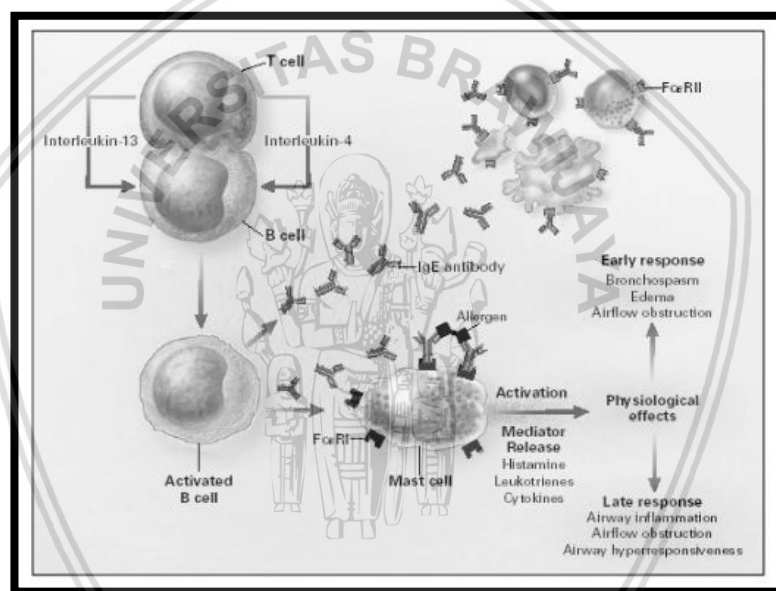
Asma merupakan inflamasi kronis saluran pernafasan yang sangat kompleks melibatkan faktor genetik, antigen, berbagai sel inflamasi, mediator dan sitokin yang akan menyebabkan kontraksi otot jalan napas, hiperaktivitas bronkus dan inflamasi jalan napas (Ardinata, 2008). Asma dapat disebabkan sejumlah faktor, antara lain alergen, virus dan iritan yang dapat menginduksi respon inflamasi (Ekarini dkk., 2012). Sistem imun dibagi menjadi dua yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler. Imunitas humoral ditandai oleh produksi dan sekresi antibodi spesifik sel limfosit B. Imunitas seluler diperankan oleh limfosit T. Sel limfosit T mengontrol fungsi Limfosit B dan meningkatkan proses inflamasi melalui aktivitas sitotoksin *cluster differentiation* 8 (CD8) dan mensekresikan berbagai sitokin. Sel limfosit T helper (CD4) dibedakan menjadi Th1 dan Th2. Sel Th1 mensekresi interleukin-2 (IL-2), IL-3, *granulocyte monocyte colony stimulating factor* (GMCSF), interferon- γ (IFN- γ) dan *tumor necrosis factor- α* (TNF- α). Sel Th2 mensekresi IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 dan GMCSF.4,5,9 (**Gambar 2.3**) (Ardinata, 2008).



Gambar 2.3 Patogenesis Asma (Ardinata, 2008).

Respon imun dimulai dengan masuknya alergen ke dalam saluran nafas akan ditangkap oleh sel dendrit yang merupakan sel pengenal antigen (*Antigen Presenting Cell / APC*). Antigen diproses di dalam APC dan dibawa ke sel limfosit T dengan bantuan *Major histocompatibility* (MHC) kelas II, limfosit T akan membawa ciri antigen spesifik, teraktivasi dan berdiferensiasi ke profil Th2. Subtipe Th2 ini merupakan subtipe utama yang terlibat pada asma, mensekresi berbagai sitokin yang bertanggung jawab bagi berkembangnya reaksi tipe lambat atau *cell-mediated hypersensitivity reaction*. Rangsangan interleukin-4 dan interleukin-13 dari Th2, akan memacu sel limfosit B untuk mensintesa IgE. IgE akan dilepas limfosit B dan melekat pada *high affinity IgE receptors* (FcεRI) pada permukaan sel mast. Bila alergen yang sama masuk lagi maka akan diikat oleh IgE dipermukaan sel mast. *Cross Linked* Reseptor IgE dengan alergen akan mengaktifkan sel mast yang menyebabkan degranulasi sel mast sehingga terjadi pelepasan *performed* mediator seperti histamin serta *newly generated* modiator

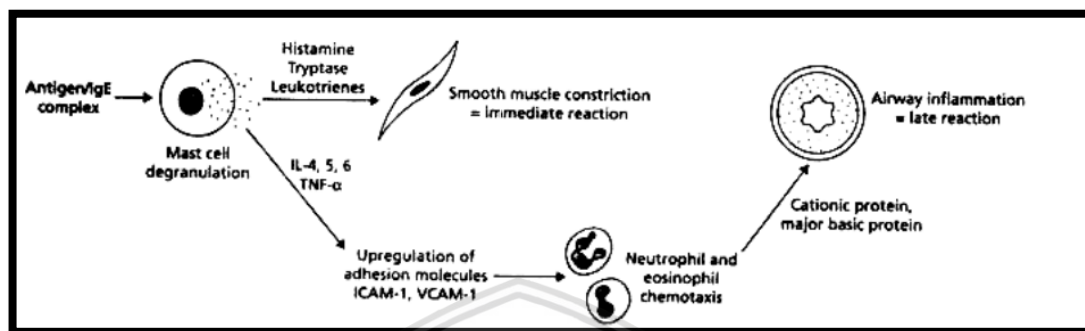
antara lain: prostaglandin, leukotrin yang menyebabkan terjadinya kontraksi otot polos bronkus, sekresi mukus, vasodilatasi. Mediator inflamasi menginduksi kebocoran mikrovaskuler yang melibatkan eksudasi plasma kedalam saluran napas. Kebocoran plasma protein menginduksi penebalan dan edema dinding saluran napas yang menyebabkan penyempitan lumen saluran napas, sehingga menyebabkan kontraksi otot pernapasan dan reaksi ini berlangsung selama 1-2 jam. Reaksi ini disebut “*early onset*” pada asma (**Gambar 2.4**). (Ardinata, 2008)



Gambar 2.4 Reaksi “*early onset*” pada asma (Ardinata, 2008)

Degranulasi sel mast juga menghasilkan sejumlah sitokin antara lain IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 dan TNF- α . Degranulasi sel mast beserta limfosit T sub tipe Th2 akan menggerakkan dan mengaktifkan sel-sel inflamasi eosinofil, basofil, neutrofil dan makrofag, melalui aktivitas sel endotel yang akan menyebabkan pembentukan molekul adhesi. Reaksi ini akan terjadi pada 4-8 jam setelah reaksi pertama dan menyebabkan kedatangan sel-sel radang sehingga meningkatkan

pelepasan mediator. Reaksi ini disebut reaksi tipe lambat (**Gambar 2.5**) (Ardinata, 2008).



Gambar 2.5 Reaksi lambat pada asma (Ardinata, 2008)

2.4 Alergen (Ovalbumin)

Alergen yang umum digunakan dalam pembuatan hewan model asma untuk menimbulkan respon inflamasi pada saluran pernafasan adalah ovalbumin (OVA) (Utomo, 2012). Ovalbumin merupakan 60-65% komponen dalam putih telur ayam, dan terdiri dari 365 asam amino dengan berat molekul 45kDa (Utama, dkk., 2012). Ovalbumin merupakan alergen yang bertanggung jawab terhadap terjadinya reaksi alergi tipe I. Sensitisasi dengan ovalbumin baik secara inhalasi, oral, maupun intraperitoneal terbukti dapat merubah kecenderungan respon imun mencit ke arah Th2 (Setyani, 2012). Ovalbumin sering menyebabkan gejala hipersensitivitas pada individu yang alergi. Ovalbumin secara luas digunakan sebagai alergen dalam membentuk hewan model asma, alergi makanan dan kulit (Sun *et al*, 2009). Paparan kronik ovalbumin sebagai alergen akan menimbulkan perubahan struktur saluran nafas dan inflamasi (Barlianto dkk., 2009).

Paparan alergen yang masuk dalam tubuh akan dikenali oleh dendrit sel sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC). Alergen kemudian dipresentasikan kepada sel limfosit T. Sel limfosit T mengeluarkan sitokin IL-3, IL-4, dan IL-13

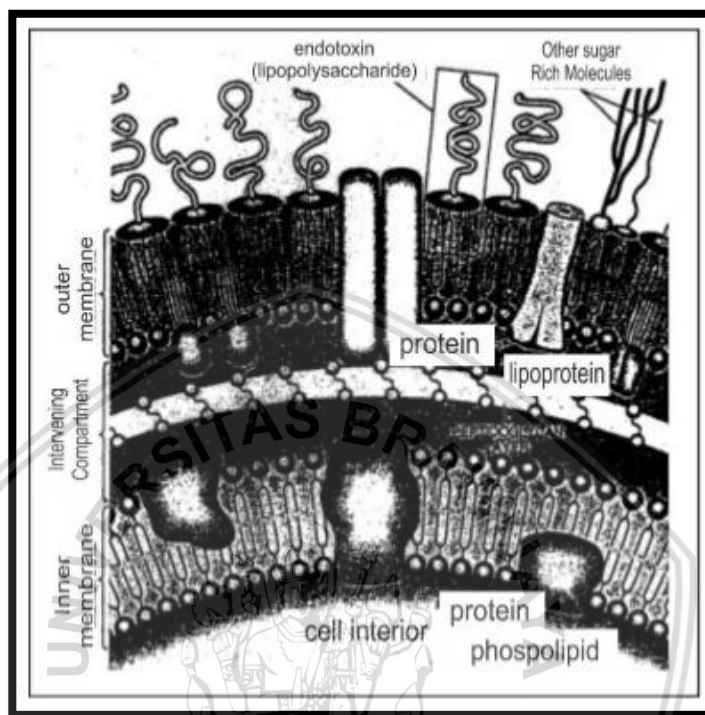
yang menginduksi munculnya sel B. Immunoglobulin-E (IgE) merupakan immunoglobulin yang bekerja spesifik terhadap reaksi alergi dihasilkan oleh sel B melekat pada sel mast yang akan berfungsi mengikat alergen. Hal tersebut mengakibatkan respon degranulasi sel mast yang menginduksi keluarnya histamin, leukotrien, dan protease yang mengawali reaksi awal asma yang dikarakterisasi dengan hipersekresi mukus, perubahan struktur saluran dan merangsang kontraksi otot polos sehingga menimbulkan penyempitan saluran nafas (Pradana, 2015).

Sensitisasi penggunaan ovalbumin secara inhalasi pada hewan coba menunjukkan *airway remodeling*. Pemberian ovalbumin memberikan gambaran peningkatan IgE dan terjadi inflamasi yang ditandai dengan infiltrasi sel radang dan eosinofil pada histopatologi saluran pernapasan (Tang dkk., 2006). Ovalbumin secara imunologi digunakan untuk merangsang munculnya alergi pada saluran pernapasan sehingga meningkatkan respon IgE dan memicu reaksi inflamasi (Xiao *et al*, 2013).

2.5 Lipopolisakarida (LPS)

Kondisi keparahan asma dapat dipengaruhi oleh infeksi yang terjadi pada rongga mulut (Smits, 2009). Bakteri penghasil lipopolisakarida (LPS) yakni *Porphyromonas gingivalis* yang banyak ditemukan dalam plak gigi. Lipopolisakarida yang biasa digunakan untuk memperparah kejadian asma berasal dari LPS bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Bakteri ini merupakan bakteri anaerob gram negatif yang tidak berspora (*non-spore forming*) dan tidak

mempunyai alat gerak (*non-motile*). Molekul LPS dari *Porphyromonas gingivalis* terdapat di permukaan *outer* membran seperti pada **Gambar 2.6**.



Gambar 2.6 Struktur dinding sel bakteri Gram (Pradana, 2015).

Lipopolisakarida sendiri tersusun atas 3 bagian yaitu lipid A, polisakarida inti dan polisakarida O. Lipopolisakarida pada bakteri memiliki bagian utama berupa lipid A yang mampu bertindak sebagai endotoksin. Lipid A menyebabkan bakteri lebih tahan terhadap fagositosis (Iman dkk., 2011). *Porphyromonas gingivalis* menyebabkan perubahan patologik jaringan periodontal dengan pengaktifan respon imun dan inflamatori pada inang. *Porphyromonas gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida (LPS) dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan sitokin (Kusumawadani dkk., 2010).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan aktivator potensial yang memicu *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat mengaktifasi sel-sel inflamatori.

Lipopolisakarida (LPS) merupakan penyusun bagian luar dari lapisan membran sebagian besar bakteri gram negatif yang disebut sebagai endotoksin. Lipopolisakarida (LPS) terdiri *hydrophilic polysoccharide* dan komponen hidrofobik yang disebut sebagai lipid A. Lipid A bertanggung jawab atas bioaktivitas utama endotoksin. Lipid A merupakan komponen hidrofobik dari LPS yang terletak di bagian luar lapisan membran luar. Lipid A diketahui bertanggung jawab terhadap alergen dari infeksi bakteri gram negatif (Wang, *et al*, 2010).

Menurut Pradana, (2015) lipopolisakarida dapat terikat dengan dinding sel saluran pernafasan melalui bantuan senyawa *Lipopolysacharide-binding protein* (LBP) dan menghantarkan LPS dikenali oleh CD14. Ikatan LPD dan CD14 akan melewati *Toll Like Receptor-4* (TLR-4) sehingga akan meningkatkan aktivasi sel dendrit dan Th-2 akan membuat sel B memproduksi IgE dan menyebabkan inflamasi. Lipopolisakarida mampu menginduksi produksi dan pelepasan sel-sel radang dan senyawa radikal bebas dalam jumlah besar yang sangat toksik. Berdasarkan penelitian Utomo (2006), paparan LPS pada tikus asma mampu memperparah kejadian asma yang mampu menimbulkan terjadinya inflamasi pada saluran pernafasan.

2.6 Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) adalah suatu molekul kimia reaktif yang dihasilkan secara enzimatis oleh L-arginin dengan induksi enzim *Nitric Oxide Sinthase* (NOS). iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) terdiri atas 3 macam bentuk yakni *Neuron Nitric Oxide* (nNOS atau NOS-1) yang terdapat

pada saraf, *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS atau NOS-2) pada makrofag yang berfungsi sebagai penanda terjadinya proses inflamasi dan *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS atau NOS-3) pada endotel pembuluh darah (Fitri dkk., 2011).

Inducible Nitric Oxide Synthase merupakan enzim yang dapat ditemukan dan dilepaskan oleh miosit, makrofag, dan sel endotel yang diaktifasi oleh sitokin dan endotoksin (Widiastuti, 2010). Peningkatan ekspresi iNOS mengindikasikan keadaan patologi dari suatu jaringan (Kim *et al*, 2009). Produksi NO dikatalis oleh salah satu enzim *Nitric Oxide Synthase* (NOS) yaitu *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS). Peningkatan ekspresi iNOS dalam jaringan menunjukkan adanya proses peradangan pada jaringan (Lukiati, 2012).

Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) yang dibantu oleh ko-faktor tetrahidrobiopterin bereaksi dengan asam amino L-arginin menjadi NO dan L-citrulline. *Nitric oxide* dalam jumlah besar menjadi lebih reaktif dan memiliki kecenderungan bereaksi dengan molekul lainnya karena terdapat elektron yang tidak berpasangan. Peningkatan NO dalam jaringan menyebabkan kerusakan jaringan (Steven, 2008).

Induksi LPS menimbulkan hipersensitifitas saluran pernapasan, *Toll-Like Receptor* (TLR) berperan dalam respon LPS. Radikal bebas yang dihasilkan akibat induksi LPS dapat menyebabkan sistem imun menurun dan terjadi kerusakan sel. Lipopolisakarida merupakan senyawa sitotoksik yang memiliki potensi sebagai stimulator produksi radikal *Nitric Oxide* (NO) (Utomo, 2006). *Nitric Oxide* adalah radikal bebas endogen yang diproduksi saluran pernapasan

dengan katalis enzim *Nitric Oxide Synthase* (NOS) dan dikenal untuk mengatur keparahan asma, termasuk modulasi saluran pernapasan. Penderita asma menunjukkan adanya peningkatan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) di saluran napas (Batra *et al*, 2007).

Secara biologis NO bertindak sebagai mediator inflamasi untuk mempertahankan fungsi homeostasis tubuh. Pada kondisi inflamasi, NO dihasilkan sebagai regulator dan efektor. Salah satu fungsi efektor NO adalah toksisitasnya terhadap tumor, antigen dan sel tubuh yang tampak pada patogenesis kerusakan jaringan. Banyak tipe sel yang merespon penyebab inflamasi dengan mengekspresikan iNOS. Inflamasi pada penyakit asma memacu pelepasan sejumlah mediator inflamasi dan makrofag pada fagositosis seperti NO. *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) menunjukkan produksi NO dalam jumlah besar untuk pertahanan imun. *Nitric Oxide* dari iNOS tidak hanya suatu mediator pertahanan imun, tetapi juga berperan dalam produksi sel lain dalam sistem regulator, memodulasi transkripsi gen, translasi dan fungsi protein (Ariesta, 2011).

2.7 Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 adalah sitokin *Pleiotropic* dengan berbagai aktivasi biologis, diproduksi oleh limfoid dan non limfoid sel berfungsi untuk mengatur reaktivitas imun, peradangan dan haematopoiesis (Kawilarang, 2014). Interleukin-6 disekresikan oleh banyak sel yaitu makrofag, monosit, eosinofil, hepatosit, dan sel glia (Tahir, 2013).

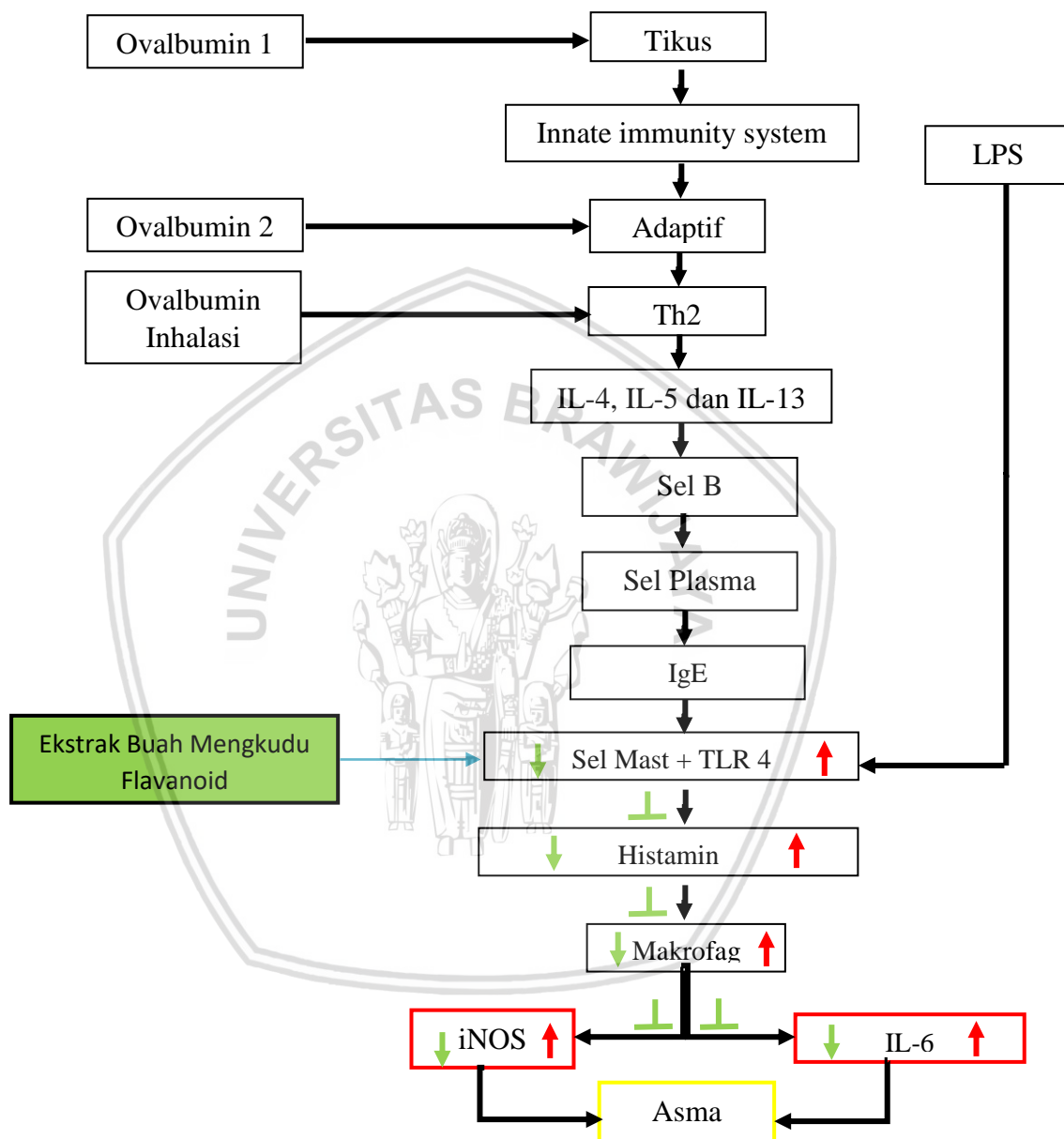
Interleukin-6 merupakan suatu sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam maturasi dan aktivasi netrofil, maturasi makrofag, dan diferensiasi sitotoksik

limfosit T dan natural killer cells. Selain itu juga mengaktifasi astrosit dan mikroglia. Interleukin-6 pertama kali diidentifikasi pada tahun 1986 dan merupakan faktor yang diproduksi oleh limfosit T, berfungsi sebagai regulator sel B dan mempunyai efek pada aktivitas dan maturasi sel B dan T, makrofag, osteoklas, kondrosit dan sel endotel (Paraskevas, 2009).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

- | | | | |
|---|---------------------------------|---|------------------------------|
| ↓ | : Patomekanisme | □ | : Efek yang terjadi |
| ↑ | : Peningkatan efek dari alergen | ■ | : Variabel bebas |
| ↓ | : Penurunan efek dari flavanoid | □ | : Variabel tergantung |
| ⊥ | : Menghambat | → | : Pengaruh pemberian ekstrak |

Pembuatan hewan coba tikus asma dilakukan dengan pemberian alergen ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS). Pemberian ovalbumin dilakukan sebanyak 3 kali dan lipopolisakarida sebanyak 2 kali. Pemberian OVA I secara intraperitoneal pada hari ke-1, pemberian LPS pada hari ke-10 dan ke-11 dilakukan secara intrasulkuler dengan melakukan inisiasi pada gingiva, pemberian OVA II secara intraperitoneal pada hari ke-14 dan pemberian OVA III secara inhalasi pada hari ke-21.

Pemberian ovalbumin I berfungsi sebagai sensitisasi untuk mengaktifkan *innate immunity respon*. Paparan ovalbumin (alergen) yang masuk akan dikenali oleh sel dendrit sebagai APC (*Antigen Presenting Cell*). Selanjutnya, APC akan mempresentasikan peptida ke sel T CD4⁺ melalui MHC-II sehingga dapat mengaktifkan sel CD4 secara langsung untuk berkembang menjadi efektor Th2.

Lipopolisakarida akan menginisiasi inflamasi secara lokal dan sistemik sehingga dapat meningkatkan respon imun nonspesifik. Lipopolisakarida akan ditangkap oleh *Lipopolysacharide Binding Protein* (LBP) dan dikenali oleh CD14. Ikatan LPS dan CD14 akan melewati *Toll Like Reseptor-4* (TLR-4) sehingga akan meningkatkan aktifitas makrofag.

Pemberian ovalbumin II sebagai aktivator dan akan menghasilkan sel imun adaptif. Aktivasi sel Th2 terlihat berperan utama dalam mengawali dan memelihara terjadinya inflamasi alergi. Pada tahapan pemaparan ulang, alergen yang telah tertangkap oleh makrofag dibawa masuk melalui sistem limfatik untuk dipresentasikan kepada sel T. Paparan antigen mengaktifkan sel Th2 dan memproduksi sitokin pro-inflamasi seperti IL-4, IL-5 dan IL-13.

Pemberian ovalbumin III sebagai paparan ulang berfungsi sebagai efektor yang akan meningkatkan aktifitas imun spesifik terlokalisasi pada organ pernafasan. Paparan ulang secara inhalasi akan menyebabkan peningkatan pelepasan sitokin pro-inflamasi dan histamin.

Sitokin IL-4 dan IL-13 dari Th2 akan merangsang sel B berkembang menjadi sel plasma yang kemudian akan mensintesis Immunoglobulin-E (Ig-E). Immunoglobulin-E berkerja secara spesifik untuk merespon adanya reaksi alergi. Immunoglobulin-E kemudian akan dilepas limfosit B dan melekat pada reseptor Fc ϵ R1 pada permukaan sel mast. Perlekatan reseptor IgE dengan alergen akan mengaktifkan sel mast yang menyebabkan degranulasi sel mast sehingga terjadi pelepasan mediator histamin yang akan mengawali reaksi sekunder berupa *airway remodeling* sehingga menimbulkan hipersekresi mukus, perubahan struktur saluran dan merangsang kontraksi otot polos saluran pernapasan sehingga menimbulkan penyempitan saluran napas.

Denaturasi sel mast beserta limfosit T akan mengaktifkan sel-sel inflamasi eosinofil, basofil, neutrofil dan makrofag, melalui aktifitas endotel yang akan menyebabkan pembentukan adhesi. Reaksi tersebut akan menyebabkan munculnya sel-sel radang sehingga meningkatkan pelepasan mediator. Proses fagositosis oleh makrofag akan menghasilkan enzim *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan sitokin Interleukin-6 (IL-6). Aktivitas fagositosis yang terjadi akan membentuk radikal bebas yang membuat kerusakan jaringan gingiva dan menyebabkan asma

Pada penelitian ini, hewan model asma akan diterapi dengan menggunakan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diketahui memiliki senyawa flavonoid sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Mekanisme antiinflamasi yang dilakukan oleh flavonoid dapat melalui penghambatan pelepasan histamin, dan penstabil *Reactive Oxygen Species* (ROS). Flavanoid berfungsi sebagai antioksidan, antikanker, antiseptik, dan antiinflamasi. Mekanisme antioksidan dan antiinflamasi akan menurunkan iNOS dan kadar IL-6 sehingga dapat menurunkan kerusakan jaringan paru.

3.2 Hipotesa Penelitian

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah sebagai berikut:

1. Pemberian Ekstrak buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mampu menurunkan kadar *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS)
2. Pemberian Ekstrak buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) mampu menurunkan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma yang terpapar ovalbumin (OVA) dan lipopolisakarida (LPS)

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April 2017 - Juni 2017. Pembuatan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dilakukan di UPT Materia Medica, Batu, Malang. Pemeliharaan dan perlakuan pada hewan coba dilakukan di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya. Pembuatan dan pembacaan preparat imunohistokimia untuk melihat ekspresi iNOS dan ekspresi IL-6 dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini, antara lain spuit, kandang tikus, preparat imunohistokimia, *dissecting set*, gunting, gelas objek, mortar, sonde, tabung ependorf (*microtube*), vortex, *water bath* 100°C, *Omron CompAir Compressor Nebulizer*, *rotary evaporator*, kertas saring, tabung 250 mL, tabung 10 mL, *micropipet*, dan mikroskop Olympus BX51.

4.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan selama melakukan penelitian antara lain, tikus putih (*Rattus norvegicus*), Ovalbumin (Sigma-Aldrich, 950512), Ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*), *Aluminium hydroxide* (AlOH_3), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Paraformaldehyde Acid* (PFA) 4%, Lipopolisakarida (LPS)_{1435/1450} dari bakteri *Porphyromonas gingivalis*

(Astarte Biologics), antibodi *anti-rat* iNOS, antibodi *anti-rat* IL-6, Navocastra Peroxidase Block, Navocastra Post Primer, Kromogen Diaminobenzinidine (DAB), Strep Avidin Horse Radish Peroxidase (SA-HRP), Natrium klorida (NaCl) fisiologis 0,9%, etanol 70%, Carboxymethyl Cellulose (CMC), alkohol 70%, alkohol 95%, alkohol 100%, xylol, hematoxylin, parafin dan tissu.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan strain Wistar jantan, berat badan 150-250 gram berumur 8-12 minggu yang didapatkan dari Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, Malang. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi jumlah sampel dihitung berdasarkan rumus (Kusriningrum, 2008):

$$\begin{aligned}
 t(n-1) &\geq 15 \\
 4(n-1) &\geq 15 \\
 4n-4 &\geq 15 \\
 4n &\geq 19 \\
 n &\geq 19/4 \\
 n &\geq 4,75 \\
 n &\geq 5
 \end{aligned}$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 4 macam kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan minimal 5 kali dalam setiap kelompok sehingga total hewan coba yang dibutuhkan adalah 20 ekor.

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancang eksperimen sederhana dan dibagi menjadi 4 kelompok secara random. Tiap kelompok terdiri dari 5 tikus. Kelompok 1 adalah tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus diberi OVA + LPS (kontrol positif), sedangkan kelompok 3 dan 4 diberi OVA + LPS + ekstrak buah *Morinda citrifolia* dengan dosis masing-masing sebesar 50 mg/kg BB dan 75 mg/kg BB.

Tabel 4.1. Rancangan Kelompok Penelitian

Variabel yang diamati	Ulangan				
Ekspresi iNOS dan Ekspresi IL-6	1	2	3	4	5
Kelompok A (kontrol negatif)					
Kelompok B (kontrol positif)					
Kelompok C (terapi dosis 50 mg/kg BB)					
Kelompok D (terapi dosis 75 mg/kg BB)					

4.5 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu :

Variabel bebas : Dosis Ekstrak Buah Mengkudu dan Induksi Ovalbumin

Variabel tergantung : Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada organ paru

Variabel kontrol : Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan Strain Wistar berumur 8-12 minggu dengan berat badan 150-250 gram, pakan tikus dan kondisi eksperimental (lingkungan, suhu dan kelembaban).

4.6 Tahapan Penelitian

4.6.1 Preparasi Hewan coba (*Rattus norvegicus*)

Tikus yang digunakan untuk penelitian diaklimatisasi selama tujuh hari agar beradaptasi dengan lingkungan laboratorium. Tikus dibagi 4 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor tikus dan diberikan pakan tikus bisa berbentuk serbuk atau pelet dan harus diberikan secara teratur. Pakan diberikan sebanyak 10% bobot badan, yaitu sekitar 10-15 gram/ekor/hari dan diberikan air minum *adlibitum* (Widiartini dkk., 2013).

Tikus dikandangkan dalam bak plastik berukuran panjang 40 cm, lebar 15 cm dan tinggi 10 cm dengan jumlah sesuai dengan jumlah tikus yang digunakan. Kemudian sangkar tersebut ditutup dengan anyaman besi yang berukuran 0,5 cm (Widiartini dkk., 2013). Kandang tikus berlokasi pada tempat yang bebas dari suara ribut dan terjaga dari asap industri serta polutan. Lantai kandang mudah dibersihkan dan disanitasi. Suhu optimum ruangan untuk tikus adalah 22-24⁰C dan kelembaban udara 50-60% dengan ventilasi yang cukup.

4.6.2 Preparasi Hewan Coba Model Asma

4.6.2.1 Tatalaksana Sensitasi Alergi dengan Ovalbumin

Tatalaksana sensitasi alergi pada tikus dengan menggunakan ovalbumin (OVA) didasarkan atas penelitian yang dilakukan oleh Utomo (2012). Pemberian dilakukan dengan menginjeksikan ovalbumin (Sigma-Aldrich) dengan dosis 10 µg/ekor OVA yang diemulsi dengan adjuvan 1,5 mg Alumunium Hidroksida (AlOH₃) dalam 200 µl *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan volume pemberian 0,2 mL/ekor pada hari ke-1 dan hari ke-14 secara intraperitoneal (Conrad *et al*, 2009). Sensitasi dilakukan dengan pemberian OVA secara inhalasi, pemaparan OVA aerosol dilakukan dalam tabung transparan yang dihubungkan dengan *Omron Compair Compressor Nebulizer* pada hari ke-21, dilakukan dengan melarutkan 1 mg OVA dalam 1 mL Natrium Klorida (NaCl) 0,9%, volume pemberian sebanyak 1mg/mL/ekor selama 20 menit (Utomo, 2012).

4.6.2.2 Tatalaksana injeksi Lipopolisakarida (LPS)

Injeksi lipopolisakarida (LPS) dilakukan secara intrasulkuler dengan dosis LPS 0,2µg/ekor dalam 0,2 mL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) volume pemberian 0,2 mL/ekor pada sulkus gingiva molar rahang atas kiri tikus sesuai yang telah dilakukan oleh Utomo (2012). LPS yang digunakan berasal dari bakteri *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*LPS1435/1450). Injeksi LPS bertujuan sebagai agen infeksi

rongga mulut dan memodulasi respon imun. Injeksi LPS intrasulkuler dilakukan berturut-turut pada hari ke-10 dan 11 (Ahmada dkk., 2012).

4.6.3 Pembuatan Ekstrak Buah Mengkudu

Buah mengkudu pascapanen, berwarna putih kekuningan merata, dan daging buah masih keras, sebanyak 20 kg dicuci bersih. Buah ditiriskan dan dipotong-potong tipis. Potongan buah selanjutnya dijemur dibawah sinar matahari, dengan naungan kain hitam. Penjemuran dilakukan beberapa hari, sampai potongan buah benar-benar kering, mudah dipatahkan dengan tangan. Potongan buah yang sudah kering, berbentuk kepingan, dipisahkan antara daging buah dengan bijinya. Bahan yang digunakan untuk penelitian adalah daging buah yang kering, dan bijinya disisihkan. Daging buah yang kering selanjutnya dibuat serbuk (*simplisia*) dengan cara dihancurkan dengan alat *blender*. *Simplisia* dibuat dengan 15 gram serbuk buah mengkudu yang siap untuk dimaserasi. Maserasi dilakukan dengan merendam *simplisia* kedalam pelarut etanol 70% sebanyak 15 ml, sampai terendam seluruhnya selama ± 24 jam, kemudian dimasukkan serbuk yang telah dibasahi dengan pelarut ke dalam toples, diratakan dan ditambah pelarut etanol 70% sampai terendam. Pelarut yang ditambahkan sebanyak 150 ml. Tutup toples dengan rapat selama 24 jam dicampur di atas *shaker* digital dengan kecepatan 50 rpm. Ekstrak cair disaring dengan penyaring kain kemudian ekstrak ditampung dalam erlenmeyer. Hasil ekstrak cair pertama diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* selama 30 menit. Hasil ekstrak cair dievaporasi kembali di atas *water bath* selama 2 jam

serbuk buah mengkudu seberat 15 gram dilarutkan kedalam 150 ml etanol 70% sehingga dihasilkan ekstrak cair sebanyak 10 ml.

Ekstrak kental yang didapat dilarutkan kembali dengan pelarut *Carboxymethyl Cellulose* (CMC) 0,1% untuk memudahkan saat proses pemberian ekstrak saat terapi. Sebanyak 0,1g CMC dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambah aquades sampai volume 100 ml kemudian dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer* (Dewi, 2010).

4.6.4 Dosis Ekstrak Buah Mengkudu

Berdasarkan penelitian Faroka dkk (2013), dosis aman buah mengkudu pada manusia adalah 500-1000 mg/kgBB. Faktor konversi dari manusia ke tikus dengan berat badan manusia 70 kg dan berat badan tikus 200 g adalah 0,018 mg. Jadi, hasil yang didapatkan yaitu 45-90 mg/kgBB. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan dosis 50 mg/Kg BB dan dosis 75 mg/Kg BB sebagai dosis eksperimental untuk terapi asma.

4.6.5 Analisis Ekspresi iNOS dan IL-6 dengan Metode Imunohistokimia

4.6.5.1 Isolasi Organ Paru

Pengambilan organ paru-paru dilakukan pada kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok terapi pada hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-35 setelah pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). Langkah awal yang dilakukan yaitu dieutanasi dengan cara dislokasi leher pada *os cervical*, kemudian dilakukan pembedahan dengan posisi tikus rebah dorsal diatas papan bedah. Pembedahan dilakukan pada bagian

abdomen hingga thorax memotong kedua sisi sternum sehingga organ paru dapat dilihat, organ paru dibilas pada cawan petri dengan NaCl fisiologis 0,9% dan direndam dengan larutan *Paraformaldehyde Acid* 4% (Aji, 2014).

4.6.5.2 Ekspresi iNOS dengan pewarnaan Imunohistokimia

Preparat paru dideparafinasi dalam xylol I, xylol II kemudian direhidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat (100%, 95%, 70%,) dan aquades secara berurutan masing-masing direndam selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit selanjutnya ditetesi dengan *Navocastra Peroxidase Block* hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% selama 30 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti-rat iNOS*) selama 24 jam dengan suhu 4 °C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Berikutnya ditetesi dengan *Navocastra Post Primer* selama 1 jam dengan suhu ruang dan dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit dan dibilas dengan steril water. Substrat DAB (*Diamonobenzidine*) ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. *Counter stain* dilakukan dengan *Hematoxylin* selama 5 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan air mengalir, dikering anginkan dan terakhir *mounting* dengan entellan (Bintari, 2016).

4.6.5.3 Ekspresi IL-6 dengan pewarnaan Imunohistokimia

Preparat paru dideparafinasi dalam xylol I, xylol II kemudian direhidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat (100%, 95%, 70%) dan aquades secara berurutan masing-masing direndam selama 10 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit selanjutnya ditetesi dengan *Navocastra Peroxidase Block* hidrogen peroksida (H_2O_2) 3% selama 30 menit, dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Preparat kemudian direaksikan dengan antibodi primer (*Anti rat interleukin-6*) selama 24 jam dengan suhu 4 °C dan dilakukan pencucian kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit. Berikutnya ditetesi dengan *Navocastra Post Primer* selama 1 jam dengan suhu ruang dan dicuci kembali dengan PBS pH 7,4 selama 3x5 menit. Preparat ditetesi dengan SA-HRP (*Strep Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit dengan suhu ruang kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit dan dibilas dengan *steril water*. Substrat DAB (*Diamonobenzidine*) ditambahkan dan diinkubasi selama 10 menit kemudian dicuci dengan PBS selama 3 x 5 menit. *Counter stain* dilakukan dengan *Hematoxylin* selama 5 menit pada suhu ruang, lalu dicuci dengan air mengalir, dikering anginkan dan terakhir *mounting* dengan entellan (Bintari, 2016).

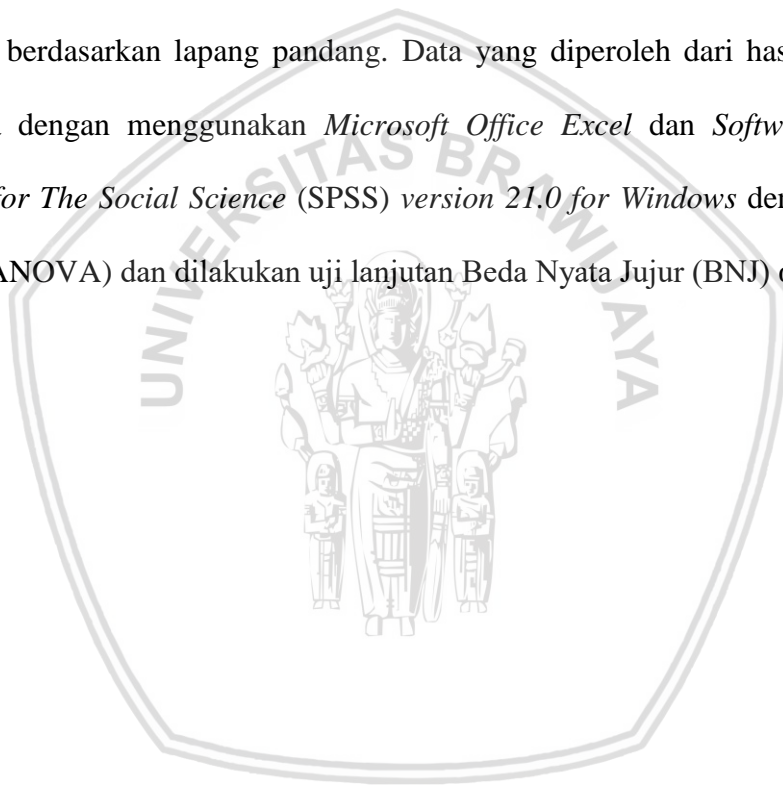
4.6.5.4 Pengamatan Ekspresi iNOS dan IL-6

Pengamatan imunohistokimia dilakukan di paru untuk mengetahui ekspresi iNOS dan IL-6. Pengamatan dengan menggunakan mikroskop

dengan perbesaran 1000x dilakukan pada 20 lapang pandang setiap kelompok (Salonica, 2012).

4.7 Analisa Data

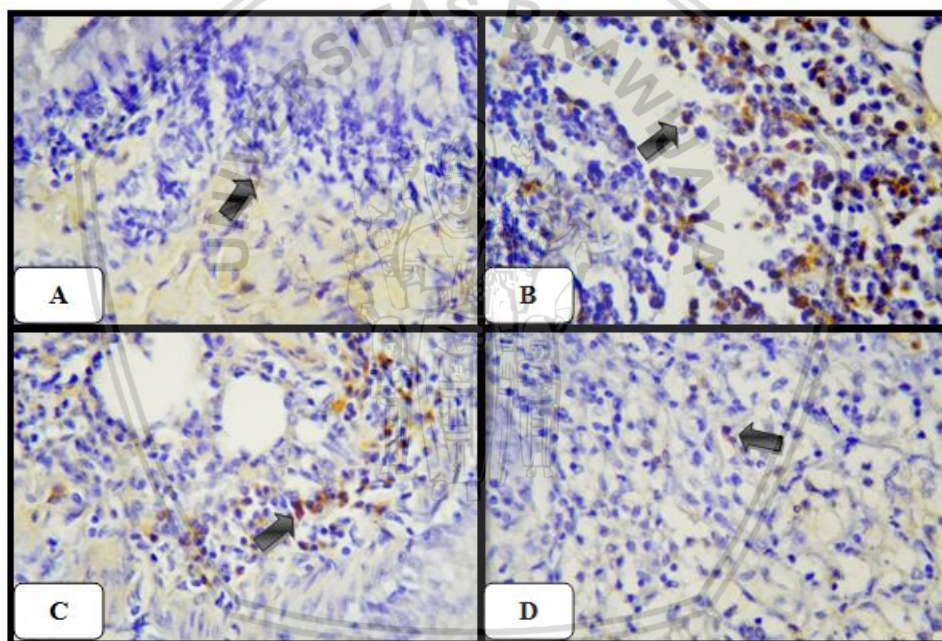
Parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan Interleukin-6 (IL-6) pada organ paru. Ekspresi iNOS dan IL-6 diamati dengan menggunakan metode *imunohistokimia* dan dihitung berdasarkan lapang pandang. Data yang diperoleh dari hasil perlakuan dianalisa dengan menggunakan *Microsoft Office Excel* dan *Software Statistic Packed for The Social Science* (SPSS) *version 21.0 for Windows* dengan analisis ragam (ANOVA) dan dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) $\alpha = 5\%$.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada Organ Paru Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hasil pengamatan ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dilakukan dengan teknik imunohistokimia organ paru tikus model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida pada setiap kelompok perlakuan dengan perbesaran 1000x (**Gambar 5.1**)



Gambar 5.1 Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada paru tikus (1000x).

Keterangan: (A) kontrol negatif; (B) kontrol positif; (C) terapi 50 mg/kg BB; (D) terapi 75 mg/kg BB.

Ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) pada masing-masing kelompok perlakuan ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada sel makrofag (**Gambar 5.1**). Warna coklat terbentuk karena adanya ikatan antara antigen dan antibodi dengan penambahan substrat kromogen. Semakin banyak

warna coklat yang terbentuk maka ekspresi *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) yang dihasilkan semakin tinggi.

Perhitungan jumlah sel makrofag yang mengespresikan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dilakukan pada setiap ulangan kelompok perlakuan dengan 20 lapang pandang menggunakan *counter*. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software* SPSS metode *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan $\alpha = 5\%$ sehingga didapatkan hasil kuantitatif (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Rata-rata jumlah sel makrofag yang mengekspresikan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) paru tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata jumlah sel makrofag \pm Standar Deviasi (sel makrofag)
A (Kontrol negatif)	$5,6 \pm 1,14^a$
B (Kontrol positif)	$41,2 \pm 1,92^d$
C (Terapi 50 mg/kg BB)	$13,6 \pm 2,4^c$
D (Terapi 75 mg/kg BB)	$9,8 \pm 1,9^b$

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap jumlah iNOS ($p < 0,05$).

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mampu menurunkan jumlah sel makrofag yang mengekspresikan *Inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) secara signifikan ($p < 0,05$) dilihat dari perbedaan notasi. Pada kelompok A (kontrol negatif) memiliki jumlah ekspresi iNOS yang rendah sebesar $5,6 \pm 1,14$ sel makrofag, karena tubuh dalam keadaan normal mengekresikan iNOS pada sel miosit, makrofag, dan sel endotel dengan jumlah yang terekspresi relatif sedikit (Widiastuti, 2010).

Kelompok B (kontrol positif) terjadi peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) yakni $41,2 \pm 1,92$ sel makrofag. Peningkatan jumlah ekspresi iNOS pada kelompok B menandakan adanya inflamasi pada jaringan paru karena pemberian ovalbumin dan induksi lipopolisakarida yang memicu reaksi fagositosis oleh makrofag. Proses fagositosis oleh makrofag nantinya akan menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan produk salah satunya *nitric oxide* (NO) yang pembentukannya dikatalis oleh *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) (Forbes *et al*, 2008). Aktivasi makrofag dapat menginduksi peningkatan *nitric oxide* (NO) dalam jumlah besar melalui aktivitas enzim iNOS, sehingga peningkatan jumlah NO berbanding lurus dengan peningkatan ekspresi iNOS. Peningkatan jumlah NO dalam keadaan asma dapat menyebabkan oksidasi NO sehingga terjadi inflamasi dan kontraksi otot bronkus yang menimbulkan penyempitan lumen sehingga menyebabkan kesulitan bernafas (Batra dkk., 2007).

Kelompok C dengan dosis 50mg/kg BB dan kelompok D dengan dosis 75mg/kg BB terjadi penurunan rata-rata jumlah sel makrofag yang mengekspresikan iNOS sebesar $13,6 \pm 2,4$ sel makrofag (dosis 50mg/kg BB) dan $41,2 \pm 1,92$ sel makrofag (dosis 75mg/kg BB) lebih rendah secara nyata apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif $41,2 \pm 1,92$ sel makrofag. Penurunan ekspresi iNOS menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) mampu menurunkan aktivasi sel-sel inflamatori seperti makrofag. Kelompok D dengan dosis terapi 75 mg/kg BB memiliki rata-rata ekspresi yang paling mendekati dengan kelompok A (kontrol negatif) yakni $5,6 \pm 1,14$ sel makrofag. Dosis terapi 75 mg/kg BB dalam penelitian ini merupakan

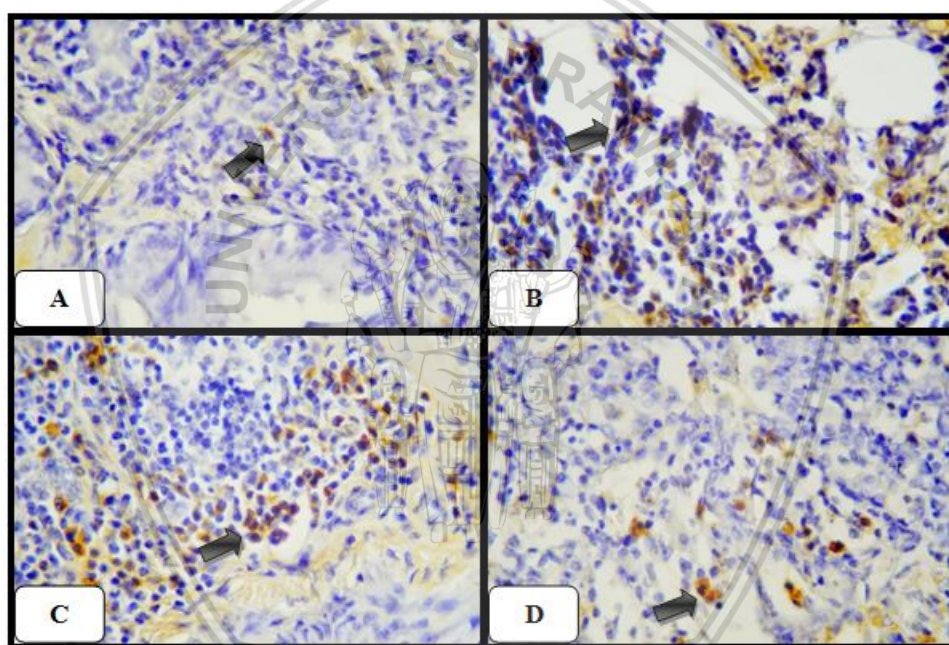
dosis optimal, dimana telah diketahui kandungan dalam ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) salah satunya adalah flavonoid dimana berperan sebagai antiinflamasi dan antioksidan.

Flavonoid sebagai anti-inflamasi akan menurunkan aktivitas dari sel mast sehingga menurunkan produksi histamin. Penurunan produksi histamin diikuti dengan penurunan produksi iNOS oleh makrofag. Penurunan jumlah iNOS akan menyebabkan penurunan jumlah NO yang teroksidasi sehingga dapat mengurangi inflamasi. *Nitric oxide* (NO) secara normal dalam jumlah yang cukup akan memberikan efek relaksasi otot polos sehingga dapat memperlancar pernapasan (Batra, dkk., 2007).

Flavonoid sebagai antioksidan dapat mencegah terjadinya reaksi berantai pembentukan radikal bebas dengan cara menstabilkan ROS. Menurut Mufidah, dkk (2012), flavonoid mampu memberikan atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) kepada radikal bebas (R^*) sehingga flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO^*) pada radikal fenoksil memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga tidak menimbulkan radikal bebas dan lebih stabil. Flavonoid juga efektif sebagai *scavenger* radikal peroksil (ROO^*), dan akan diregenerasi menjadi $ROOH$, dan radikal hidroksil (OH^*) akan diregenerasi menjadi H_2O . Hasil dari regenerasi tersebut bersifat lebih stabil.

5.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia. L.*) terhadap Ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Model Asma

Hasil pengamatan ekspresi Interleukin-6 (IL-6) dilakukan dengan teknik imunohistokimia organ paru tikus model asma yang diinduksi ovalbumin dan lipopolisakarida pada setiap kelompok perlakuan dengan perbesaran 1000x (**Gambar 5.2**)



Gambar 5.2 Ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada paru tikus (1000x).
Keterangan: (A) kontrol negatif; (B) kontrol positif; (C) terapi 50 mg/kg BB;
(D) terapi 75 mg/kg BB.

Ekspresi Interleukin-6 (IL-6) pada masing-masing kelompok perlakuan ditandai dengan terbentuknya warna coklat pada sel makrofag (**Gambar 5.2**). Warna coklat terbentuk karena adanya ikatan antara antigen dan antibodi, dengan penambahan substrat kromogen. Semakin banyak warna coklat yang terbentuk maka ekspresi Interleukin-6 (IL-6) yang dihasilkan semakin besar.

Perhitungan jumlah sel makrofag yang mengespresikan Interleukin-6 (IL-6) dilakukan pada setiap ulangan kelompok perlakuan dengan 20 lapang pandang menggunakan *counter*. Data yang diperoleh dianalisa secara statistik menggunakan *software* SPSS metode *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan $\alpha = 5\%$ sehingga didapatkan hasil kuantitatif (Tabel 5.2).

Tabel 5.2 Rata-rata jumlah sel makrofag yang mengekspresikan interleukin-6 (IL-6) paru tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-rata jumlah sel makrofag \pm standar deviasi (sel makrofag)
A (Kontrol negatif)	$14,8 \pm 2,77^a$
B (Kontrol positif)	$232,8 \pm 6,22^d$
C (Terapi 50 mg/kg BB)	$57,2 \pm 5,63^c$
D (Terapi 75 mg/kg BB)	$18,6 \pm 3,04^a$

Keterangan : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap ekspresi IL-6 ($p < 0,05$).

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) mampu menurunkan jumlah sel makrofag yang mengekspresikan interleukin-6 (IL-6) secara signifikan ($p < 0,05$) dilihat dari perbedaan notasi. Pada kelompok A (kontrol negatif) memiliki jumlah ekspresi IL-6 yang rendah sebesar $14,8 \pm 2,77$ sel makrofag. Hal ini disebabkan karena pada keadaan normal sitokin terdapat didalam tubuh walaupun dalam jumlah sedikit sebagai sistem kekebalan tubuh (Listyawati dkk., 2012).

Kelompok B (kontrol positif) terjadi peningkatan yang signifikan yakni $232,8 \pm 6,22$ sel makrofag. Peningkatan jumlah ekspresi IL-6 pada kelompok B menandakan adanya inflamasi pada jaringan paru. Peningkatan ekspresi IL-6 pada kelompok B (kontrol positif) karena pemberian ovalbumin pada tikus sebagai

alergen terhadap asma yang diperparah oleh induksi lipopolisakarida yang memicu reaksi fagositosis oleh makrofag dan neutrofil. Peningkatan ekspresi IL-6 pada kelompok B menunjukkan tingginya aktifitas sel-sel inflamatori yang berperan dalam proses inflamasi yang terjadi sebagai respon terhadap induksi alergen. Hal ini sesuai dengan pendapat Karnen (2010), bahwa peningkatan aktivitas makrofag akan menghasilkan sitokin proinflamasi salah satunya IL-6. Interleukin 6 merupakan salah satu sitokin yang memegang peranan penting dalam reaksi inflamasi. Interleukin-6 (IL-6) merupakan suatu sitokin yang terlibat dalam inisiasi serta pemeliharaan respons inflamasi dan imunologis yang sebagian besar dihasilkan oleh makrofag.

Sitokin interleukin-6 adalah mediator yang terlibat dalam respon pro-inflamasi. Pada saat terjadi inflamasi sitokin IL-4 dan IL-13 dari Th2 akan merangsang sel B berkembang menjadi sel plasma yang kemudian akan mensintesis IgE dan melekat pada reseptor $Fc\epsilon R1$ pada permukaan sel mast. Perlekatan reseptor IgE dengan alergen akan mengaktifkan sel mast yang menyebabkan degranulasi sel mast sehingga terjadi pelepasan mediator histamin yang akan mengawali reaksi sekunder berupa *airway remodeling* sehingga menimbulkan hipersekresi mukus, perubahan struktur saluran dan merangsang kontraksi otot polos saluran pernapasan sehingga menimbulkan penyempitan saluran napas. Degranulasi sel mast beserta limfosit T akan mengaktifkan sel-sel inflamasi eosinofil, basofil, neutrofil dan makrofag, melalui aktifitas endotel yang akan menyebabkan pembentukan adhesi (Pradana, 2015). Pada saat terjadi inflamasi sel makrofag residen dan makrofag datangan akan menghasilkan

sejumlah sitokin salah satunya IL-6 (Interleukin-6), dimana IL-6 tersebut akan meningkatkan terjadinya kerusakan jaringan.

Pada kelompok C (terapi 50mg/kg BB) dan D (75mg/kg BB) terjadi penurunan jumlah sel makrofag yang mengekspresikan IL-6 akibat pemberian dari ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan rata-rata kelompok C ($57,2 \pm 5,63$) dan kelompok D ($9,8 \pm 1,9$) lebih rendah secara nyata apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ($18,6 \pm 3,04$). Pada penelitian ini, hewan model asma akan diterapi dengan menggunakan ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang diketahui memiliki senyawa flavonoid sebagai anti-inflamasi. Mekanisme anti-inflamasi dengan menurunkan ikatan sel mast dengan Ig-E sehingga produksi histamin turun. Penurunan histamin diikuti dengan penurunan jumlah makrofag. Hal tersebut berpengaruh pada produksi IL-6 pada sel makrofag. Menurut Faroka, dkk., (2013), flavonoid berperan sebagai anti-inflamasi sehingga dapat menghambat pembentukan histamin oleh sel mast. Penurunan histamin berbanding lurus dengan penurunan makrofag. Mekanisme antiinflamasi akan menurunkan kadar IL-6 sehingga dapat menurunkan kerusakan jaringan paru.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) mampu menurunkan ekspresi iNOS pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dengan dosis optimal yaitu 75mg/kg BB.
2. Pemberian terapi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) mampu menurunkan ekspresi IL-6 pada organ paru tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dengan dosis optimal yaitu 75mg/kg BB.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka saran yang dapat diberikan yaitu diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) model asma dengan rentang dosis dan frekuensi pemberian yang bervariasi untuk mengetahui dosis efektif dari ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) sebagai terapi kuratif.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmada, R., Aulanni'am, W.A. Wardhana. 2012. *Terapi Ekstrak Daun Putri malu (Mimosa pudica) pada Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkiolus*. [Skripsi] Universitas Brawijaya : Malang.
- Aji, Y.L. 2014. *Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica, Linn) terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) dan Gambaran Histopatologi Paru pada Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. [Skripsi] Universitas Brawijaya : Malang.
- Ardinata, D. 2008. Eosinofil dan Patogenesis Asma. *Jurnal Kedokteran Nusantara* 41(4):268-273.
- Ariesta, R.L. 2011. *Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD), Kadar Malondialdehid (MDA), Ekspresi iNOS dan Gambaran Histologis Jaringan Pankreas Tikus Diabetes Melitus tipe I yang Mendapat Terapi Ekstrak Temu Giring* [Thesis] FMIPA Universitas Brawijaya : Malang
- Aryadi, I.G.A.I.P. 2014. *Pengaruh Ekstrak Daun Mengkudu (Morinda citrifolia L.) terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus sebagai Penyebab Abses Periodontal secara In Vitro*. Universitas Mahasaraswati Denpasar : Denpasar.
- Barlianto, W., M.S.C. Kusuma, S. Karyono, dan K. Mintaroem. 2009. Pengembangan Model Mencit Alergi dengan Paparan Kronik Ovalbumin. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 25(1):1-4.
- Batra, J., R. Chatterjee, dan B. Ghosh. 2007. *Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS): Role in Asthma Pathogenesis*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 44:303-309.
- Bintari, G.I. 2016. *Deteksi Aeromonas hydrophila pada Ginjal Mencit (Mus musculus) dengan Teknik Imunohistokimia*. [Skripsi] Universitas Airlangga: Surabaya.
- Broide, D.H. 2008. Immunologic and Inflammatory Mechanism that Drive Asthma Progression to Remodeling. *Journal Allergy Clinical Immunology* 121(3):560-572.
- Carey, S.A. 2011. *Feline Asthma: A Pathophysiologic Basic of Therapy*. Michigan State University of Veterinary Medicine. USA.
- Conrad, M.L., A.O. Yildirim, S.S. Sonar, A. Kilic, S. Sudowe, M. Lunow. 2009. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clinical Experimental Allergy* 39:1246-1254.
- Cornell Feline Health Center. 2014. *Feline Asthma*. http://www.vet.cornell.edu/fhc/Health_Information/Asthma.cfm. [10 Maret 2017].

- Dewi, F.K. 2010. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (Morinda citrifolia, Linnaerus) terhadap Bakteri Pembusukan Daging Segar*. [Skripsi] Universitas Sebelas Maret : Surakarta.
- Ekarini, N.L.P. 2012. *Analisis Faktor-Faktor Pemicu Dominan Terjadinya Serangan Asma pada Pasien Asma*. [Tesis] Universitas Indonesia : Jakarta.
- Faroka, D., R. Sri, M. Rifa'I. 2013. Peran Senyawa Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) terhadap Ekspresi CD62L pada Limpa Mencit yang Diberi Paparan *Staphylococcus aureus*. *El-Hayah* 3(2):53-59.
- Fitri, L.E., S. Imam, R. Rita. 2011. Kombinasi Klorokuin dan N-Acetyl cysteine Menurunkan Ekspresi iNOS Tubulus Proksimal Ginjal Mencit yang Diinfeksi Plasmodium berghei. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 26(4):221-226.
- Forbes, J. M., M. T. Coughlan and M. E. Cooper. 2008. Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes diabetes. *journals organic* 57:1446-1454.
- Iman, E.R.S., R. Ratih, E.N. Hasutji, Suryani dan T. Wiwiek. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Veteriner I*. Pusat Penerbitan dan Percetakan Universitas Ailangga.
- Johnson, M. 2012. Laboratory Mice and Rats. Labome: The world of laboratories. mary at labome dot com. Synatom Research, United States. *Mater Methods*, 2 : 113 *Journal of Chromatography* 756(2):189-198.
- Karnen, G., dan B. Iris. 2010. *Immunologi Dasar*. Jakarta: Balai penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kawilarang, A.F. 2014. *Perbedaan Kadar Interleukin-6 dan Prostaglandin E-2 Serum Pada Kehamilan Preterm Dengan Ketuban Pecah Dini dan Kehamilan Preterm Normal*.
- Kim, J., Y.M. Seok, K.J.Jung, and K.M.Park. 2009. Reaction Oxygen Species/ Oxidative Stress Contributes To Progression Of Kidney Fibrosis Following Transient Ischemic Injury In Mice. *American Journal of Physiology* 178:5375-5382.
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Buku Ajar Perancangan Percobaan, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga*. Dani Abadi : Surabaya.
- Kusumawadani, B., P. Pujiastuti, dan D.Sari. 2010. *Uji Biokimiawi Sistem API 20 A Mendeteksi porphyromonas gigivalis Isolat Klinik dari Plak Subgingiva Pasien Periodontitis Kronis*. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember: Jember.
- Listyawati, D I., Aulanni'am, Herawati. 2012. *Efek Terapi Perasan Buah Labu Siam (Sechium edule) Terhadap Aktivitas Protease Dan Ekspresi TNF-α Pada Jejenum Tikus (Rattus norvegicus) Inflammatory Bowel Disease (IBD) Hasil Induksi Indometasin*. Universitas Brawijaya : Malang.

- Lukiati, B., Aulanni'am, dan W. Darmato. 2012. Profil Distribusi iNOS Dan Kadar NO Pankreas Tikus Diabetes Melitus Hasil Induksi MLD-STZ Pasca Pemberian Ekstrak Etanol Temugiring (*Curcuma heyneana*). *Jurnal Kedokteran Hewan* 6(2):120-124.
- Mufidah, N., Aulanni'am, dan D.K. Wuragil. 2012. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica L.) Terhadap Ekspresi Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) dan Gambaran Infiltrasi Inflamatori Pada Bronkiolus Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. [Skripsi] Universitas Brawijaya: Malang.
- Nguyen, K., J. Peng, and E. Boulay. 2010. Effect of Smoking on the Association Between Environmental triggers and Asthma Severity Among Adults in New England. *Journal of Asthma and Allergy Educators* 10(10):1-9.
- Nials, A.T., and S. Uddin. 2008. Mouse Models of Allergic Asthma: Acute and Chronic Alergen Challenge. *Journal Disease Models and Mechanisms* 1(4):213-220.
- Olah, G. 2014. *Witch Drugs Are Used to Treat Feline Asthma?*. Albuquerque Cat Clinic Albuquerque, New Mexico.
- Paraskevas, C., A. Greenhough, H.J.M. Smartt, A.E. Moore, H.R. Robert, A.C. Williams. 2009. *The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment*. *Carcinogenesis* 3(3):377-86.
- Pertiwi, H.O.M., Aulanni'am, Herawati. 2012. *Aktivitas Protease dan Gambaran Histopatologi Epitel Bronkus Akibat Pengaruh Terapi Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica Linn.) Terhadap Hewan Tikus (Rattus norvegicus) Model Asma*. [Skripsi] Universitas Brawijaya : Malang.
- Pradana, R A. 2015. *Pengaruh Pemberian Omega 3 Terhadap Pengukuran Profil Protein Dan Protease Paru Pada Hewan Tikus (Rattus Norvegicus) Model Asma Yang Diinduksi Lipopolisakarida*. [Skripsi] Universitas Brawijaya: Malang.
- Rahmawati, A. 2009. *Kandungan Fenol Total Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.)*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia : Jakarta.
- Reinero, C.R. 2011. Advances in the Understanding of Pathogenesis, and Diagnostic and Therapeutics for Feline Allergic Asthma. USA: University of Missouri Columbia. *The Veterinary Journal* 190:28-33.
- Rengganis, I. 2008. Diagnosis dan Tatalaksana Asma Bronkial. *Majalah Kedokteran Indonesia* 11(58):444-451.
- Rita, H.R. 2001. *Pengaruh Defisiensi Pakan Terhadap Nilai Kecernaan Nutrien dan Pertumbuhan Tikus Putih Jantan Dewasa (Rattus sp.)*. [Skripsi] institute Pertanian Bogor: Bogor.
- Rizki, M.I., L. Chabib, B. Yusuf. 2015. Tanaman dengan Aktifitas Anti-Asma. *Jurnal Pharmascience* 2(1):1-9.

- Salonica, I.T., C. Mahdi, M.C Padaga. 2012. *Ekspresi iNOS Dan Gambaran Histopatologi Hepar Hewan Model Tikus (Rattus norvegicus) Hiperkolesterolemia yang Diterapi Yogurt Susu Kambing* [Skripsi] Universitas Brawijaya: Malang.
- Sari, C.Y. 2015. Penggunaan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) untuk Menurunkan Tekanan Darah Tinggi. *Jurnal Majority* 4(3):34.
- Setyani, N. 2012. *Jumlah Limfosit Pada Mencit Yang Diberi Konsumsi Ekstrak Alkohol Daun Mimba (Azadirachta indica, A. Juzz) dan di Induksi Ovalbumin*. [Skripsi] Universtas Jember.
- Setyawan, D.A. 2008. Senyawa Biflavonoid pada *Selaginella* Pal. Beauv. dan Pemanfaatannya. *Jurnal Biodiversitas* 9(1): 64-81.
- Shin, Y.S. K. Takeda, and E.W. Gelfand. 2009. Understanding asthma using animal models. National Library of Medicine National Institutes of Health, US. *Allergy Asthma Immunology Research* 1(1):10-18.
- Sitepu dan Josua. 2012. *Perbandingan Efektifitas Daya Hambat terhadap Staphylococcus Aureus dari Berbagai Jenis Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda Citrofolia Liin) (In vitro)*. [Skripsi] Universitas Sumatera Utara : Medan.
- Smits, J. 2009. *Oral Health and the Connection to Respiratory Disease, 482 Oral Disease: Prevention and Management*. University of Michigan Dental Hygiene E-Learning Program. Michigan.
- Steven, C., George, Yixin Shi, V. Ahramahzd, Tatavoosian, A.S. Aledia, S.P. Galant. 2008. *The cut points for Asthma Control Test are higher in Mexican children in orange country, California*. *Ann Allergy Asthma Immunology* 2(13):108-115.
- Sun, L.Z., S. Elsayed, T.B. Aasen, T. Van Do, N.P. Aardal., E. Florvaag, and K. Vaali. 2009. Comparison between Ovalbumin and Ovalbumin Peptide 323-339 Responses in Allergy Mice: Humoral and Selular Aspects. *Scandinavian Journal of Immonology* 71:329-335.
- Tahir, I., K Wijaya, dan D Widianingsih. 2013. *Terapan Analisis Hansch untuk Aktivitas Antioksidan Senyawa Turunan Flavon/Flavonol*. Artikel Seminar Chemometrics-Chemistry. Gadjah Mada University : Yogyakarta.
- Tang, M.L.K, J.W. Wilson, and A.G. Stewert. 2006. *Airway remodeling in Asthma: Current Understanding and Implication For future theraphies*. *Pharmacology and Therapeutic* 112(3):474-488.
- Utama, D.A., H. Esti, M.H. Dewi. 2013. Pengaruh Kecepatan Pengadukan terhadap Karakteristik Fisik Mikrosfer Ovalbumin-Alginat dengan Metode Aerosolisasi. *Jurnal Pharma Scientia*. 2(2):1-3.

- Utomo, H. 2012. Rapid Relief Mechanism of Allergic Rhinosinosis after “Assisted Drainage” Therapy. *Journal of Dentistry Indonesia* 19(3):57-64.
- Wang, X., and P.J.Quinn. 2010. Review Lypopolysaccaride: Biosynthetic Pathway And Structure Modification. *Progress in Lipid Reasearch*. Elsevier 49(5):77-107.
- Widiartini, W., S. Eka, S. Ana, M.R. Ita, P. Eko. 2013. Pengembangan Usaha Produksi Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Tersertifikas Dalam Upaya Memenuhi Kebutuhan Hewan Laboratorium. *Jurnal Fakultas Peternakan dan Pertanian*. Universitas Diponegoro : Semarang.
- Widiastuti, 2010. *Perbedaan Kadar Nitric Oxide Dan Derajat Stenosis Pada Penderita Penyakit Jantung Koroner Dengan Dan Tanpa Diabetes Melitus* [Tesis] Universitas Diponegoro: Semarang.
- Xiao, H., A.N. Rizzo., J. Siegler., and W. Chen. 2013. The Importance of Bronchial Epithelial Jinction Integrity in Asthma. Institute for Personalized Respiratory Medicine University of Illinois Chicago, USA. *Journal Allergy and Therapy* 2155-6121.
- Zosky, G.R., A.N. Larcombe, O.J. White, J.T. Burchell, and D.J. Turner. 2007. Ovalbumin Sensitised Rat are Good Model for Airway Hiperresponsiveness. Clinical And Experimental Alergy. *Journal of Immunology* 179:5748-5749.